

機関番号:10101

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2009~2010

課題番号:21770065

研究課題名(和文) 褐藻類の細胞質分裂における隔膜融合の仕組みと関連タンパク質の探索

研究課題名(英文) Analysis of membrane fusion process and related proteins on cytokinesis of brown algae

研究代表者

長里 千香子 (NAGASATO CHIKAKO)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号:00374710

研究成果の概要(和文):

褐藻類の細胞質分裂に関わる平板小囊 (flat cisternae; FC)とゴルジ体由来小胞 (Golgi derived vesicles; GV) の融合過程について、エプサイジング接合子において透過型電子顕微鏡を用いた電子線トモグラフィー法により調べた。また細胞質分裂期のヒバマタ接合子とアクチン重合阻害剤で細胞質分裂の進行が抑制されている接合子からそれぞれタンパク質を抽出し、二次元電気泳動を行った。スポット解析を行った結果、細胞質分裂が阻害されている接合子ではコントロールと比較して 31 個のタンパク質で発現量が低下し、2 個のタンパク質では増加していた。

研究成果の概要(英文):

In this study, a three dimensional analysis was performed by electron tomography in zygotes of *Silvetia babingtonii*, for understanding the transitional membrane configuration during cytokinesis. The analysis revealed that a complicated architecture with fringes (TA; tubule-like appendage) were formed by fusion of Golgi derived vesicles to flat cisternae (FCs). Each FC was connected by TAs, thus forming the membranous network (MN). At advanced cytokinesis, the MN grew into broad membranous sac (MS). To turn the 3D image to arbitrary angle indicated a stratification of membrane fusion process from the MN to the MSc. Moreover, proteins extracted from zygotes of *Fucus distichus* on cytokinesis and cytokinesis blocked zygotes treated with latrunculin B were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). From a total of about 600 spots reproducibly separated on gels, 2-DE from cytokinesis blocked zygotes showed 31 under-expressed and 2 over-expressed proteins in comparison with control.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野:生物学

科研費の分科・細目:基礎生物学・形態・構造

キーワード:植物形態

## 1. 研究開始当初の背景

褐藻類の細胞質分裂は、1970年代と80年代に行われた微細構造観察から、細胞膜のくびれ込みによって行われていると考えられてきた。しかしながら、褐藻類の微細構造観察に急速凍結置換法が導入されるようになると、多くの褐藻類の細胞質分裂は細胞内部からの隔膜の形成によって行われていることが明らかになった。現在のところ、細胞膜のくびれ込みによって細胞質分裂が完了する褐藻は1種類のみ報告されているが、いずれの場合も隔膜の構築には平板小囊 (flat cisterna; 短軸方向が20 - 60 nm、長軸方向が600 nmの電子密度の高い円盤状の構造で急速凍結置換法を導入することにより初めて可視化された構造)とゴルジ体由来が関わっていることが示されている。さらに隔膜形成過程に見られる膜構造の変化、細胞壁沈着タイミングについても次々に明らかになってきた。これらの結果は、陸上植物で見られる細胞板形成との類似点を示すと同時に、特異性も明確にしている。

## 2. 研究の目的

褐藻類の細胞質分裂に関与する平板小囊は、特異的な膜構造であり、一般に細胞壁合成成分を運搬すると言われているゴルジ体由来の小胞とは機能が異なると予想される。本研究では特性の異なる平板小囊とゴルジ体由来小胞が融合し隔膜を形成する仕組みを明らかにするために、三次元透過型電子顕微鏡/電子線トモグラフィー解析を行った。さらに細胞質分裂に関与するタンパク質の探索を行うために、細胞質分裂時の細胞と細胞質分裂阻害が生じている細胞からタンパク質を抽出し二次元電気泳動のスポットパターンを比較した。

## 3. 研究の方法

### 電子線トモグラフィー解析

褐藻エゾイシゲ (*Silvetia babingtonii*) の接合子は急速凍結置換固定法(浸漬法)により試料作製を行った。電子線トモグラフィー用試料は、0.3 - 1.0  $\mu\text{m}$  の切片を調整し、フォルムバル支持膜を張ったスロットグリッドに載せた。切片は酢酸ウランと鉛による二重染色を施した後に、反対側の面にも支持膜を貼り、三次元再構成における座標合わせのため、直径15 nmもしくは20 nmの金粒子を両面に添加した。さらにカーボン蒸着を両面に施した。観察はH-9500(使用加速電圧300kv)、H-3000(使用加速電圧2000kv)で行った。一つの試料に対して、試料面を90°回転させる2軸連続傾斜像(傾斜角度 $\pm 60^\circ$ 、 $1^\circ$ 刻み)を取得し、データセットはIMOD softwareを用い、三次元再構成像を作成した。

## 2) タンパク質解析

第1回目の細胞質分裂時にあたる受精後20時間のヒバマタ接合子と受精後14時間から20時間まで1 $\mu\text{M}$  latrunculin Bを投与し細胞質分裂阻害が起きている接合子から全タンパク質を抽出し、二次元電気泳動を行った。スポット解析はPD Quest (BIO RAD)を用いた。

## 4. 研究成果

### (1)電子線トモグラフィー解析

褐藻エゾイシゲ接合子は同調的に発生が進行し、第一回目の細胞質分裂は受精後20時間で行われる。最初の分裂により葉状細胞と仮根細胞が形成されるが、第二回目の細胞質分裂は受精後24時間で両細胞において同時に観察される。本解析では第二回目の細胞質分裂が行われている細胞を対象とした。

通常の透過型電子顕微鏡による観察から褐藻エゾイシゲの細胞質分裂では①平板小囊とゴルジ体由来小胞が付加することによって厚みと直径を増した小囊 (EFCs; expanded flat cisternae) が形成される、②各EFCの融合により網状膜構造 (MN; membranous network) が出現する、③ MN内に存在する網目部分が徐々に縮小・消失し、嚢状膜構造 (MS; membranous sac) が形成される、④ 分裂予定域に数カ所にわたり形成されたMSは融合しながら拡張し母細胞壁に到達する、という一連の膜構造変化が存在していることが示されている。このような細胞質分裂過程に見られる複雑な膜構造変化について透過型電子顕微鏡(使用加速電圧300kV, 2,000kV)を用いた電子線トモグラフィー法により3次元構造解析を行った。

### ① 隔膜形成初期;FCとGVの融合

細胞質分裂はFCとGVの融合により開始されるが、細胞質分裂面に見られる多くの平板小囊がその縁辺部分よりチューブ状の付属構造 (TA; tubule-like appendage) を発達させていた。TAは平板小囊を核として徐々に付加するゴルジ体由来小胞によって形成されている構造と考えられる(図1)。近接するFCは互いのTA部分を交差させMNを構築していることが明らかになった。

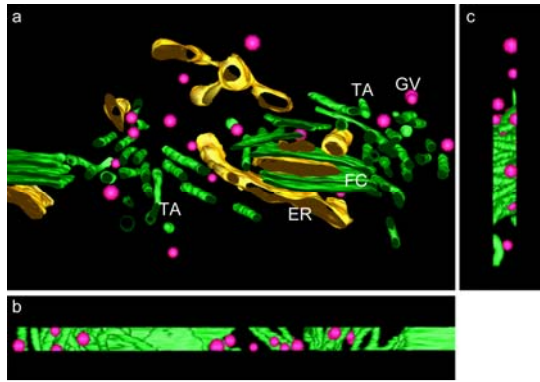


図1. 隔膜形成初期の立体再構成モデル図  
a. 小胞体 (ER) に並行して見られる平板小囊 (FC) にはチューブ状付属構造 (TA) が発達している。ゴルジ体由来小胞 (GV) が TA 周辺に存在している。b と c はモデルを x 軸、y 軸方向へ回転させた像。各 FC は TA を介して連結し、MN を構築している。

② 立体再構築を行い細胞質分裂面の横断面を観察することでMNからMSといった膜融合過程の階層化が存在していることが確かめられた。膜融合の進行は細胞質分裂面の数ヶ所で見られるが、隣り合うMS同士が融合する際、MSの凹凸が顕著になり突部の内部には多くのギャップ、表面には被覆ピットが頻度よく観察された。MSの融合と拡張が進むと内部のギャップは小さくなり、完成した隔膜には膜孔は存在していなかった。

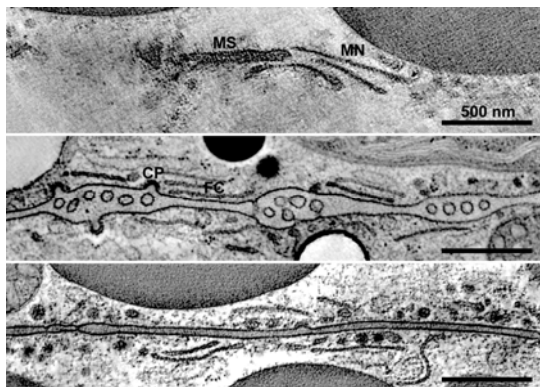


図2. MSの形成と融合  
MNからMSが形成される(上)。MS同士の連結部分には多くのギャップと被覆ピット(CP)が観察される(中)。融合と拡張が進むと内部のギャップは消失する(下)。

③ MSの出現から融合、細胞質分裂が完了し、繊維状の細胞壁成分が蓄積するステージにおいて  $1 \times 1 \times 0.1 \mu\text{m}^3$  当たりのMS/隔膜の体積と表面積をトモグラフィーのデータを基に数値化した。各ステージにおいて3か所ずつ解析を行い、平均と標準偏差を求めた。その結果、MS同士の連結部分で、一時的に体積、表面積ともに増加するが、エンドサイトーシスにより、ギャップ部分からの膜の回収が行われると、MSの体積が1/3程度、表面積は1/2程度に減少していることが明らかになった。このステージ以降は繊維状の細胞壁成分が蓄積する時期にむけて再度、体積、表面積が増加していく事が明らかになった。

④ これまで明確にされていなかったFCの形成

過程について関連する構造が捉えられた。核分裂後の娘核間に発達する小胞体群の近傍に電子密度が高く細長い不定形構造が存在しており、一部から平板小囊が出現している様子が観察された。この平板小囊の中間構造には、沿うよう微小管が配向していることから、平板小囊形成と微小管との相互関係についても新たに示唆された(図3)。

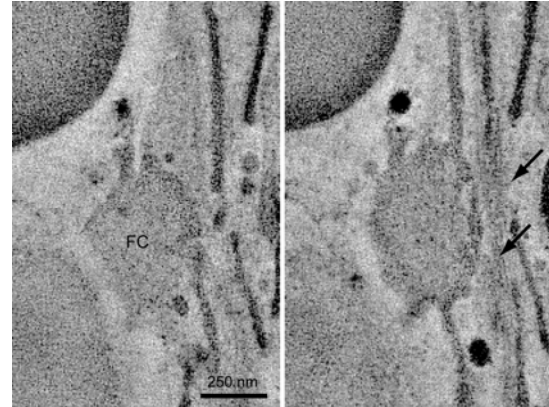


図3. 小胞体近傍に見られた平板小囊の中間構造。平板小囊(FC)の端に細長い不定形膜構造が広がる。平行して微小管(矢印)が配向する。

## (2) タンパク質解析

褐藻類では、アクチン重合阻害剤を用いると核分裂は進行するが細胞質分裂が抑制されることが明らかになっている。ヒバマタ受精後20時間の接合子と受精後14時間から20時間までアクチン重合阻害剤であるlatrunculin B (LB) 処理をした接合子からタンパク質を抽出し、2次元電気泳動を行った(図4)。

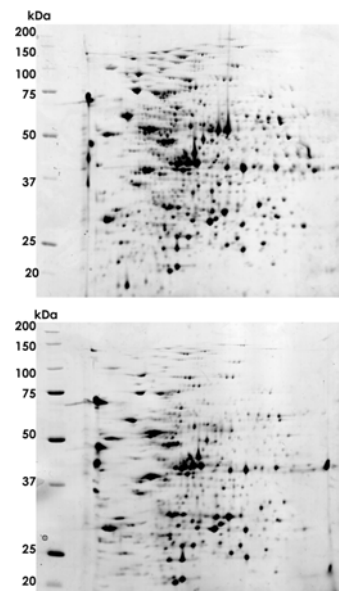


図4. パマタ受精後20時間の接合子(左)と受精後14-20時間LB処理をした接合子(右)より抽出したタンパク質の2次元電気泳動  
サンプル添加量: 約175μg  
一次元目: ImmobilineDrystrip 11cm (pH 4-7)  
二次元目: SDS-PAGE (10%)  
染色: CBB

各サンプルに対して3回ずつ電気泳動を行い、PDQuest (BIO RAD)を用い、発現に差異のあるスポットを解析した。

その結果、コントロールで見られた6個のタンパク質がLB処理をしたものでは検出されなかった。さらに25個のタンパク質がLB処理では発現量

が低下しており、2 個のタンパク質で増加していることが示された (図 5)。

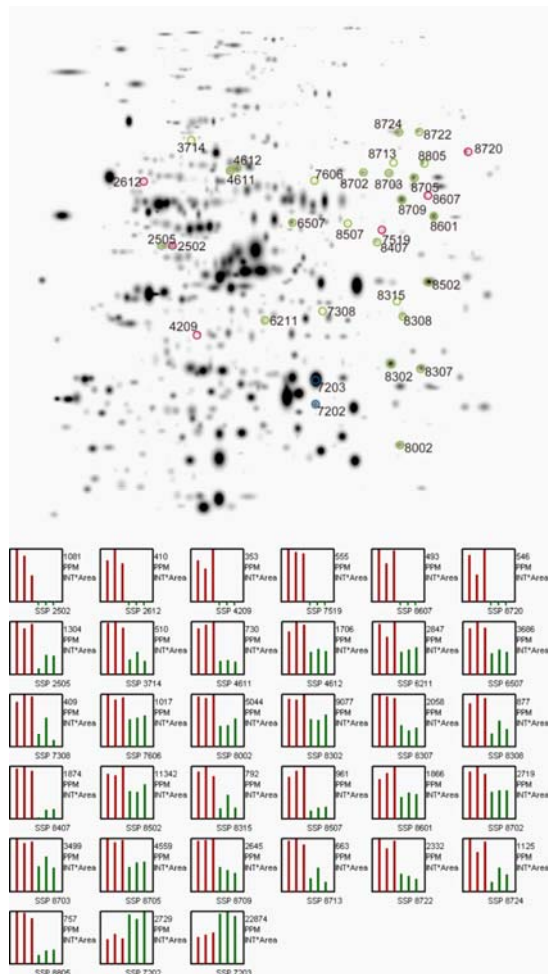


図 5. スポット解析の結果。ゲル内のサークルはコントロールのみで検出されるスポット (○)、LB 処理で発現が低下するスポット (○)、LB で発現が増加するスポット (●) を示している。グラフはゲルで検出されたスポットのシグナルの強さを示している。赤；control、緑；LB 処理。

これらのタンパク質に関しては、LC/MS/MS による同定を試みている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Nagasato, C., Inoue, A., Ojima, T., Okuda, K., and Motomura, T. Membrane fusion process and assembly of cell wall during cytokinesis in the brown alga, *Silvetia babingtonii* (Fucales, Phaeophyceae). *Planta* (2010) 232; 287–298. 査読有

② Terauchi, M., Kato, A., Nagasato, C. and Motomura, T. Analysis of expressed sequence tags from the chrysophycean alga *Ochromonas danica* (Heterokontophyta) *Phycological Research* (2010) 58; 217–221. 査読有

③ Cock, J. M., Sterck, L., Rouzé, P., Scornet,

D., Allen, A. E., Amoutzias, G., Anthouard, V., Artiguenave, F., Aury, J.-M., Badger, J. H., Beszteri, B., Billiau, K., Bonnet, E., Bothwell, J. H. F., Bowler, C., Boyen, C., Brownlee, C., Carrano, C. J., Charrier, B., Cho, G. Y., Coelho, S. M., Collén, J., Corre, E., Da Silva, C., Delage, L., Delaroque, N., Dittami, S. M., Doubeau, S., Elias, M., Farnham, G., Gachon, C. M.M., Gschloessl, B., Heesch, S., Jabbari, K., Jubin, C., Kawai, H., Kimura, K., Kloareg, B., Küpper, F. C., Lang, D., Le Bail, A., Leblanc, C., Lerouge, P., Lohr, M., Lopez, P. J., Martens, C., Maumus, F., Michel, G., Miranda-Saavedra, D., Morales, J., Moreau, H., Motomura, T., Nagasato, C., Napoli, C. A., Nelson, D. R., Nyvall-Collén, P., Peters, A. F., Pommier, C., Potin, P., Poulain, J., Quesneville, H., Read, B., Rensing, S. A., Ritter, A., Rousvoal, S., Samanta, M., Samson, G., Schroeder, D. C., Ségurens, B., Strittmatter, M., Tonon, T., Tregear, J., Valentin, K., von Dassow, P., Yamagishi, T., de Peer, Y. V. and Wincker, P. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in the brown algae. *Nature* (2010) 465; 617–621. 査読有

④ Kimura, K., Nagasato, C., Kogame, K. and Motomura, T. Disappearance of male mitochondrial DNA after the 4-celled stage sporophyte of the isogamous brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *Journal of Phycology* (2010) 46; 143–152. 査読有

⑤ Motomura, T., Nagasato, C. and Kimura, K. Cytoplasmic inheritance of organelles in brown algae. *Journal of Plant Research* (2009) 52; 185–192. 査読有

⑥ Yamagishi, T., Motomura, T., Nagasato, C. and Kawai, H. Novel proteins comprising the Stramenopile tripartite mastigoneme in *Ochromonas danica* (Chrisophyceae). *Journal of Phycology* (2009) 45; 1100–1105. 査読有

⑦ Ishikawa, M., Takahashi, F., Nozaki, H., Nagasato, C., Motomura, T. and Kataoka, H. Distribution and phylogeny of the blue light receptors aureochromes in eukaryotes. *Planta*, (2009) 203; 543–552. 査読有

[学会発表] (計 22 件)

① 寺内真, 梶村直子, 長里千香子, 本村泰三; 褐藻数種を用いた原形質連絡の微細構造解析 (日本藻類学会第 35 回大会, 富山大学, 富山, 2011 年 3 月 28 日)

② G. Fu, C. Nagasato, T. Ito, N. Kajimura, T. Motomura; Ultrastructural studies on *Ectocarpus siliculosus* flagella during development of zoosporogenesis (日本藻類学会第 35 回大会, 富山大学, 富山, 2011 年 3

月 28 日)

③木村 圭, 長里千香子, 本村 泰三; 褐藻ウガノモクを用いた卵と精子のオルガネラDNAメチル化程度の比較解析(日本藻類学会第 35 回大会, 富山大学, 富山, 2011 年 3 月 27 日)

④長里千香子, 寺内真, 本村泰三; 電子線トモグラフィ法で観る褐藻の細胞質分裂装置と原形質連絡構造(日本顕微鏡学会第 35 回関東支部講演会, 東京大学, 東京, 2011 年 3 月 5 日)

⑤寺内真, 梶村直子, 長里千香子, Christos Katsaros, 峰雪芳宣, 奥田一雄, 本村泰三; 褐藻におけるplasmodesmataの微細構造解析(日本植物学会第 74 回大会, 中部大学, 春日井, 2010 年 9 月 10 日)

⑥長里千香子, 梶村直子, 峰雪芳宣, 本村泰三; 電子線トモグラフィ法で見る褐藻エゾイシゲの細胞質分裂過程(日本植物学会第 74 回大会, 中部大学, 春日井, 2010 年 9 月 10 日)

⑦Schmid, D., Nagasato, C., Motomura, T. and Boland, W.: Something you always wanted to know about - characterization of sex-related proteins of Scytosiphon lomentaria. (Ectocarpus 2010, Ghent University, Ghent, Belgium, April 8, 2010)

⑧Kimura, K., Nagasato, C. and Motomura, T.: Difference of male mitochondrial digestion and mitochondrial DNA elimination after fertilization between isogamous and oogamous brown algae. (Ectocarpus 2010, Ghent University, Ghent, Belgium, April 8, 2010)

⑨Nagasato, C., Kajimura, N., Ueki, C., Mineyuki Y. and Motomura, T.: Electron tomographic analysis of cytokinesis in *Silvetia babingtonii* zygotes. (Ectocarpus 2010, Ghent University, Ghent, Belgium, April 8, 2010)

⑩Terauchi, M., Kajimura, N., Nagasato, C., Katsaros, C., Mineyuki, Y., Motomura, T.: Ultrastructural study on plasmodesmata formed during cytokinesis in brown alga *Dictyota dichtoma*. (Ectocarpus 2010, Ghent University, Ghent, Belgium, April 8, 2010)

⑪長里千香子, 梶村直子, 植木知佳, 峰雪芳宣, 本村泰三; 電子線トモグラフィ法を用いた褐藻エゾイシゲの細胞質分裂における膜構造変化の解析(日本藻類学会第 34 回大会, 筑波大学, つくば, 2010 年 3 月 21 日)

⑫寺内真, 梶村直子, 長里千香子, Christos Katsaros, 峰雪芳宣, 本村泰三; 褐藻アミジグサにおける細胞質分裂時に形成される plasmodesmataの微細構造解析(日本藻類学会第 34 回大会, 筑波大学, つくば, 2010 年 3 月 21 日)

⑬長里千香子, 本村泰三: 褐藻類の細胞質分裂に関与する 2 種の膜構造と膜融合過程

(第 32 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2009 年 12 月 9 日)

⑭長里千香子; 進化の原動力=細胞内共生(日本植物学会第 73 回大会, 山形大学, 山形市, 2009 年 9 月 20 日)

⑮遠藤寛子, 太田修平, 長里千香子, 本村泰三, 石田健一郎; クロララクニオン藻 *Partenskyella glossopodia*における細胞質分裂過程の形態学的観察(日本植物学会第 73 回大会, 山形大学, 山形市, 2009 年 9 月 18 日)

⑯長里千香子, 井上品, 尾島孝男, 奥田一雄, 本村泰三; 褐藻類の細胞質分裂における膜融合過程と細胞壁形成のタイミング(日本植物学会第 73 回大会, 山形大学, 山形市, 2009 年 9 月 18 日)

⑰Yamagishi, T., Motomura, T., Nagasato, C., and Kawai, H.: Novel proteins composing the stramenopile tripartite mastigoneme in *Ochromonas danica* (Chrysophyceae). (第 9 回国際藻類学会議, 代々木オリンピックセンター, 東京, 2009 年 8 月 5 日)

⑱Schmid, D., Nagasato, C., Muck, A., Loele, A., Svatoš, A., Motomura, T. and Boland, W.: Sex-related proteins in *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae) - a comparative proteomic approach. (第 9 回国際藻類学会議, 代々木オリンピックセンター, 東京, 2009 年 8 月 5 日)

⑲Endo, H., Ota, S., Nagasato, C., Motomura, T. and Ishida, K.: Ultrastructural observation on the nuclear division of a chlorarachniophyte alga, *Partenskyella glossopodia*. (第 9 回国際藻類学会議, 代々木オリンピックセンター, 東京, 2009 年 8 月 5 日)

⑳Terauchi, M., Kato, A., Nagasato, C. and Motomura, T.: The EST Analysis and Fundamental Experiment for Gene transformation in Chrysophycean alga *Ochromonas danica*. (第 9 回国際藻類学会議, 代々木オリンピックセンター, 東京, 2009 年 8 月 5 日)

㉑Kimura, K., Kogame, K. Uwai, S., Nagasato, C. and Motomura, T.: Differences of elimination timing in male mitochondria and mitochondrial DNA after fertilization between isogamous and oogamous brown algae. (第 9 回国際藻類学会議, 代々木オリンピックセンター, 東京, 2009 年 8 月 5 日)

㉒Nagasato, C., Inoue, A., Ojima, T., Okuda, K., and Motomura, T.: Membrane fusion during cytokinesis of brown algae, *Fucus distichus* and *Silvetia babingtonii* (Fucales, Phaeophyceae). (第 9 回国際藻類学会議, 代々木オリンピックセンター, 東京, 2009 年 8 月 5 日)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fsc.hokudai.ac.jp/muroran/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

長里 千香子(NAGASATO CHIKAKO)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号:00374710